

モノクローナ抗体による癌原性化合物活性化酵素, ラットチトクロームP-448アイソザイムの解析

著者	菱沼 隆則
号	169
発行年	1987
URL	http://hdl.handle.net/10097/15739

氏 名（本籍）
ひし ぬま たか のり
菱 沼 隆 則

学 位 の 種 類
薬 学 博 士

学 位 記 番 号
薬 博 第 1 6 9 号

学位授与年月日
昭和 6 3 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件
学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程
東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 薬学専攻

学 位 論 文 題 目
モノクローナル抗体による癌原性化合物活性化酵素，ラットチトロームP-448アイソザイムの解析

論文審査委員 (主 査)
教授 橋 本 嘉 幸 教授 南 原 利 夫
教授 鈴 木 康 男

論文内容要旨

環境中の癌原性化合物による発癌を支配する要因としては、化合物の吸収、発癌前駆体の代謝活性化、活性体の細胞感受性等が考えられるが、特に癌原性化合物の生体内における代謝活性化はその発癌活性を考える上で重要な要因である。

化合物の代謝は、主に肝ミクロゾーム (Ms) 中のチトローム P-450 (Cyt. P-450) によって行なわれるが、これら Cyt. P-450 には多様なアイソザイムが存在し、薬物代謝酵素誘導剤及び種々の化合物の投与により量的、質的な変動を受けることが知られている。ラット肝における、主な誘導剤と精製されたアイソザイムを Table 1 にまとめた。

Table 1 Purified Cyt. P-450 from Rat Liver

Inducer	CO-difference spectrum(λ max)	Heme λ max spinstate	M.w.	Nomenclature		
				Levin	Kamataki	Omura
PB, PCB	450	L	52 ~ 53	P-450b	P-450	PB-1
PB, PCB	450.6	L	52	P-450e	---	---
MC, ISF, PCB	447	H	53 ~ 54	P-450d	P-448-H	MC-2
MC, BNF, PCB	447	L	56	P-450c	P-448-L	MC-1

PB: Phenobarbital ISF: Isosafrole

MC: 3-Methylcholanthrene BNF: β -naphthoflavone

多くの癌原性芳香族アミンも例外ではなく肝において Cyt. P-450 のアイソザイムである高スピ型 Cyt. P-448 (Cyt. P-448H : Levin's P-450d) によって代謝活性化を受ける。さらにこれら化合物の投与により Cyt. P-448H が誘導されるという報告もあり、Cyt. P-448H 誘導のより詳細な検討は、芳香族アミンによる癌化機構の解明に重要であると考えられる。

そこで、Cyt. P-448H の誘導効果、分子化学的性質、局在性等の物質レベルでの検索に有用な、Cyt. P-448H に対する単クローン抗体を作製し、10 種のクローンを得た。精製標品との反応性 (Table 2) から

- ① Cyt. P-448H 特異的な反応性を持つ APH-1
- ② Cyt. P-448L との交差反応が認められる APH-2, APH-3, APH-4, APH-5
- ③ 加えて PCB-P-450-Ic, PCB-P-450-Id の P-450 系のアイソザイムをも認識する, APH-6, APH-7, APH-8, APH-9, APH-10

の 3 群に分けられたこれらの抗体は、Cyt. P-450 活性は阻害しないものの、ELISA および

Table 2 Reactivity of monoclonal antibodies to purified cytochrome P-450 isozymes

Monoclonal antibody	Reactivity ^a							
	P-448H		P-448L		P-450-Ic		P-450-Id	
	1 ^b	2 ^c	1	2	1	2	1	2
APH-1	6	30	0	2	0	0	0	0
APH-2	8	30	0	10	0	0	0	1
APH-3	9	30	1	14	0	0	0	1
APH-4	11	30	2	20	0	0	0	1
APH-5	15	30	4	11	0	0	0	1
APH-6	17	30	4	30	0	2	0	3
APH-7	30	30	21	30	1	6	3	30
APH-8	30	30	18	30	5	30	9	30
APH-9	30	30	30	30	4	30	7	30
APH-10	30	30	30	30	8	11	14	30

^a Absorbancy(414 nm)×10. Absorbancy larger than 3.0 is scored as 30

^b Assayed by ELISA. ^c Assayed by Protein A-ELISA.

Immunoblot において各薬物のCyt. P-448H誘導能に相関した結果を示し、Cyt. P-448Hの誘導におけるアイソザイムの解析、精製等に有用であると推察されたため、以下の研究に用いた。

従来、発癌感受性の種差、系統差並びに性差と、癌原性化合物による活性化代謝酵素の誘導率との相関性は、2-アセチルアミノフルオレン (AAF) や3-メチルコラントレン (MC)、アミノ酸の熱分解物であるTrpP-1を用いた研究により検討されてきたが、発癌剤の臓器特異性と活性化酵素の誘導効果の相関性については未だ十分な解析はなされていない。

そこで、Cyt. P-448H選択的な誘導剤である2-メトキシアミノアゾベンゼン (2-MeO-AAB) とCyt. P-448HとCyt. P-448L (Levin's P-450c) の2つのアイソザイムを誘導するMCを用い、SDラット諸臓器におけるCyt. P-448アイソザイムの量的、質的変動とその代謝活性化能を、抗Cyt. P-448H MoAbを用いた免疫学的方法及び癌原性芳香族アミンを基質とした突然変異原性試験により比較検討した。その結果、2-MeO-AABは肝においてCyt. P-448Hを選択的に誘導し、他の臓器では誘導能を示さないこと、MCは肝においてCyt. P-448LとCyt. P-448Hの両アイソザイムを誘導するが、他の肺、腎、小腸ではCyt. P-448Lのみを誘導しうること、の2点が明らかとなった。

これまでに、ラット諸臓器のCyt. P-448アイソザイムの誘導効果はMCにおいて検討されており、MCの誘導効果については上と同様の結果が報告されているが、2-MeO-AABのようなCyt. P-448H選択的かつ臓器特異的 (肝) な誘導剤は、未だ知られていない。

芳香族アミンを代謝活性化する（N-水酸化を触媒する）Cyt. P-448Hが、同じ芳香族アミン（2-MeO-AAB, 3-MeO-AABなど）によって高率に、しかも標的臓器である肝特異的に、誘導されることより、2-MeO-AABによるCyt. P-448Hの選択的誘導能は発癌剤の臓器特異性を支配する一因となることが示唆された。

また、特異的なCyt. P-448Hの誘導にはAh receptorとは異なる型のreceptor proteinの存在が示唆され、同タンパクの解析等にも2-MeO-AABは重要な誘導剤であると考えられた。

そこでこの臓器（肝）特異的で、かつCyt. P-448H選択的な誘導剤2-MeO-AABの、in vitroにおけるCyt. P-448アイソザイムの誘導効果を、抗Cyt. P-448モノクローナル抗体による免疫化学的方法および、癌原性芳香族アミンを基質とした突然変異原性試験を指標として検討した。

その結果、Cyt. P-448H選択的な誘導剤である2-MeO-AABがin vitroではCyt. P-448Lのみを誘導すること、Cyt. P-448HおよびCyt. P-448Lの両アイソザイムを誘導したMCが、in vitroではCyt. P-448Lのみを誘導することが明らかとなった。この結果よりCyt. P-448には各アイソザイムで異なった誘導機構が存在することが示唆された。すなわち、培養肝細胞および肝以外の臓器におけるCyt. P-448H誘導能の消失は、Cyt. P-448H誘導機構の欠損、もしくは減少によるものと推定されたが、この点については、2-MeO-AABのin vivo およびin vitroにおける誘導能の、より詳細な検討により解明されるものと考えられる。

Donryu雌性ラット肝より株化されたdiploid cell line, Ac2Fはin vitroで癌原性芳香族アミン3'-methyl 4 dimethylaminoazobenzen (3'-MeDAB) によりトランスフォームし、腫瘍原性を獲得するため、細胞内にその代謝活性化酵素（Cyt. P-448アイソザイム）の存在が推察された。そこで、さらに培養肝細胞株におけるCyt. P-448の検討を行なった。

一般に、肝細胞中のCyt. P-450は癌化の過程や、培養により減少、もしくは消失することが知られており、その酵素含量は微量であると予想された。

しかしながら、モノクローナル抗体を用いた免疫学的方法とUDS誘起能の検討により、Ac2Fおよび関連細胞株において核外膜に、Cyt. P-448H特異的な抗体に対応するアイソザイムの局在が明らかになり、さらにAc2FにおいてTrpP-1, GluP-2の基質特異的な代謝活性化能の存在も明らかとなった。

核膜上のCyt. P-450については、これまで正常ラット肝における検討がなされているが、肝細胞株については知られていない。

本研究の結果より、Ac2Fには基質を選ぶCyt. P-448Hが、微量ながら選択的に核外膜および周辺器官に存在することが推定されるが、まだ検討は不十分であり、今後の解明が必要である。

また、癌化のステージ変化に伴うCyt. P-448H対応抗原の減少、ならびに核外膜への局在性が認められCyt. P-450発現能の相異が示唆されるとともに、この抗原の癌性変化のマーカーと

しての有用性も推察された。

以上、本研究ではラットの臓器、培養肝細胞そして培養肝細胞株においてCyt. P-448アイソザイムの解析を行なったが、Cyt. P-448Hの誘導効果を整理すると、肝臓において他の臓器との比較検討より2-MeO-AABの肝特異的かつCyt. P-448H選択的誘導能が明らかとなり、Cyt. P-448H特異的な誘導機構の存在が示唆されるとともに、同基質は以後の検索で有効に使用された。

しかしながら、培養肝細胞への2-MeO-AABの効果はin vivo とは異なり、Cyt. P-448L特異的な誘導であった。MCにおいてもCyt. P-448Hの誘導能が失われ、Cyt. P-448Lのみの誘導を示すことより、Cyt. P-448H特異的な誘導機構の、培養細胞における消失や、それ自身もしくはなんらかの調節因子の変化に伴うCyt. P-448Lの誘導機構への変化等がその理由として考えられた。また、培養肝細胞を用いた系はCyt. P-448H誘導の点からはin vivoを反映せず、モデルとしては適当でないことも明らかとなり、Cyt. P-448H特異的な誘導機構の早期の解明とそのモデルの開発が望まれる。

さらに、培養肝細胞株Ac2Fにおいては核外膜上にCyt. P-448H関連抗原が検出された。従来の方法では検出不能であった株化肝細胞におけるCyt. P-450の存在を明らかにした点で注目され、またそのCyt. P-450は、特定の芳香族アミン基質のみを代謝活性化するある種のCyt. P-450アイソザイムであることにも興味をもたれる。今後、肝の前癌変化とCyt. P-450アイソザイム表現との関連性を追求することにより、化学発癌におけるCyt. P-450の意義を求めていく。

審 査 結 果 の 要 旨

多くの化学発癌剤は生体内で代謝された後に細胞遺伝子と反応し、細胞の癌性変異を惹起する。チトクロームP-450 (P-450) はこの代謝を媒介する主な酵素であるがP-450には種々のアイソザイムがあり、それぞれが触媒する基質も異なることが知られている。これ迄の研究により芳香族アミン型発癌剤の代謝活性化には主としてP-450アイソザイムの一つ、P-448H、が関与し、また芳香族アミン型発癌剤のラットへの投与によりこのアイソザイムが選択的に誘導されることなどが報告されているが、著者はラットのP-448Hの分子性状、局在性誘導パターンなどを追求し、その化学発癌における意義について検討を行なった。

先ず、P-450アイソザイムの検出、同定のために必要な、各種P-450アイソザイムに対するモノクローナル抗体を作成し、その性状をしらべた(第2章)。次に、このモノクローナル抗体の利用並びに変異原性テストによって芳香族アミン及び3-メチルコラントレン(MC)によって誘導されるP-450アイソザイムについて検討し、P-450アイソザイム誘導の臓器特異性を明らかにした(第3章)。

著者はさらに細胞レベルでの研究を行なった。培養肝細胞を芳香族アミンまたはMCで処理した場合のP-450の変化について検討し、この場合には生体内投与で誘導されるP-450分子種とは異なり、P-448Hは誘導されず、P-448Lと呼ばれるアイソザイムのみが選択的に誘導されるという興味ある知見をえた(第4章)。また、一般に、培養系細胞ではP-450は殆ど消失していることが報告されているが、著者は、モノクローナル抗体の利用により培養系肝臓細胞においてはP-450は一般の存在部位とは異なり、核膜に局限して存在していることを発見し、またその種類はある特定の発癌性芳香族アミンに対してのみ作用するP-448H型のアイソザイムであることを確認した(第5章)。

以上の研究は化学発癌剤の示す癌原性とその活性化代謝にあずかるP-450の分子種との関係を知るうえで極めて有用な知見を提供するものと考えられ、本論文は博士論文として十分に評価される。